

ДАНИО РЕРИО КАК МОДЕЛЬНЫЙ ОБЪЕКТ В ИССЛЕДОВАНИЯХ АКТИВНОСТИ МОЗГА

Данилова М.С., Ломтатидзе О.В.

Уральский федеральный университет имени первого Президента России

Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия

peltiedan@gmail.com, olga.l@mail.ru

Аннотация. Данио рерио в последние годы широко применяется в исследованиях активности мозга. Их применению способствуют их морфофизиологические, генетические, эмбриологические и поведенческие особенности, небольшие временные затраты и затраты на их разведение. Целью данной статьи являлось обобщение имеющихся данных об использовании Данио рерио в исследованиях активности мозга. В результате были определены их преимущества перед остальными животными объектами и направления исследований, использующих Данио в качестве модели.

Ключевые слова: данио рерио, зебрафиш, модельный объект, эмбрионы, мозг, кальциевая визуализация

DANIO RERIO AS A MODEL OBJECT IN STUDIES OF BRAIN ACTIVITY

Danilova M., Lomtavidze O.

Ural Federal University named after the first President of Russia B. N. Yeltsin,

Yekaterinburg, Russia

Abstract. Danio rerio has been widely used in studies of brain activity in recent years. Their use is facilitated by their morphophysiological, genetic, embryological and behavioral characteristics, small time and cost of their breeding. The purpose of this article was to summarize the available data on the use of zebrafish in studies of brain activity. As a result, their advantages over other animal objects and directions of research using zebrafish as a model were determined.

Key words: danio rerio, zebrafish, model object, embryos, brain, calcium imaging

Вступление

За последнее время рыба Данио рерио стала растущим чемпионом в исследованиях заболеваний человека. Несмотря на некоторые недостатки, это один из лучших экспериментальных организмов в неврологических исследованиях. В связи с детальной изученностью их генома, эмбриогенеза, особенностей поведения и физиологических явлений, Данио были использованы во многих исследованиях заболеваний человека.

Цель данного исследования

Обобщение имеющихся данных об использовании Данио рерио в исследованиях активности мозга и установление их преимуществ и недостатков в рамках проведения конкретных экспериментов.

Материалы и методы

В рамках данной работы был проведен анализ зарубежных работ (за период с 2017 по 2020 гг.), посвященных исследованиям активности мозга с использованием Данио рерио в качестве модельного объекта.

Результаты исследования

Данио рерио (зебрафиш) – это маленькая пресноводная тропическая рыбка, природный ареал распространения которой охватывает реки Индии, Пакистана, Мьянмы, Непала, Бутана и Бангладеш. Данный организм является популярным не только для содержания в аквариумах, но и широко применяется в качестве лабораторного животного. Данио имеют продолговатую форму тела, основной тон окраски которого серебристый с ярко-синими полосами. Края плавников могут быть окрашены в желтый цвет. Особым свойственен половой диморфизм – брюшко самки значительно толще, чем у самца.

Одними из главных преимуществ использования Данио в качестве модельного объекта являются относительно большая величина размеров эмбриона, а также их прозрачность, что облегчает проведение различных манипуляций. Стоит упомянуть также достаточно высокую репродуктивную способность – при оптимальных условиях они способны выметать до трёхсот икринок в неделю, – что в совокупности с их быстрым развитием (через три дня после оплодотворения у эмбриона функционирует сердце, кровеносная и нервная системы) позволяет ускорить процесс исследования и сократить затраты средств и времени [1, 3]. Несмотря на то, что использование эмбрионов Данио в определенных методах лечения, которые применимы у более крупных

животных, ограничено, они являются ценным модельным объектом для проведения разноразностных исследований.

Геном Данио был секвенирован и детально изучен, а его сравнение с человеческим показало, что они гомологичны на 70%. В том числе, в геноме рыбки находятся гомологи 80% генов, ответственных у человека за наследственные моногенные заболевания [4, 5].

Особь Данио рерио демонстрирует устойчивое поведение и физиологические явления, которые позволяют проводить массовый скрининг лекарств и легко моделировать заболевания. Из-за всех описанных выше преимуществ, рыбы Данио были использованы в исследованиях заболеваний человека, включая гематологические нарушения, опухоли, сердечные, мышечные, почечные расстройства, расстройства центральной нервной системы (в частности, генетически обусловленные) и заболевания глаз [2]. Так как этот модельный объект достаточно просто генетически модифицировать, именно на нём можно с лёгкостью изучать развитие нервной системы, и то, как экспрессия того или иного гена влияет на её развитие.

Эмбрионы как модель для визуализации активности головного мозга

Эмбрионы Данио часто служат экспериментальной моделью в исследованиях, целью которых является визуализация всего мозга для выявления взаимодействий между различными структурами мозга, возникающих во время поведенческой активности, которая лежит в основе фототаксиса, оптомоторного рефлекса и спонтанного плавания. Сами исследователи, выбирая данный модельный объект, аргументируют это тем, что небольшой размер и прозрачность эмбрионов Данио рерио позволяют регистрировать активность всего мозга в разрешении одной клетки [6].

Также известно их использование в визуализации мозга во время индуцированных приступов эпилепсии. В рамках данного исследования судорожная активность была индуцирована пентилентетразолом, для подтверждения которой происходила запись потенциала локального поля мозга. Эмбрионы были иммобилизованы путём парализации панкуронием и встраиванием в агарозу. Эксперимент проводился на предметном столике конфокального микроскопа. Визуализация производилась на уровне разрешения всего мозга и отдельных нейронов. Выбор эмбрионов Данио для проведения эксперимента авторы аргументируют, основываясь на сочетании высокой значимости для позвоночных (включая человека), прозрачности внешних структур и небольшом размере мозга (около 100 000 нейронов), что позволило визуально охватить в нём несколько областей [7].

Паттерны активности мозга для оценки эффективности лекарств и побочных эффектов

В исследовании Peter M. Eimon и соавторы создали новый способ оценки эффективности препаратов использованием установки, регистрирующей потенциалы локального поля мозга одновременно от нескольких эмбрионов Данио *in vivo*, и паттернов активности мозга. Исследователи делают акцент на скрининге противоэпилептических препаратов, используя такую значимую модель в подобных исследованиях, как рыбки Данио. В работе также отмечается, что на момент написания статьи Данио рерио уже показали большие перспективы в изучении острых припадков и генетической эпилепсии. Те эмбрионы, которые были подвержены воздействию пентилентетразола и других конвульсантов, проявляют повышенную судорожную двигательную активность. Сами приступы можно изучать с помощью автоматизированных систем отслеживания поведения, а их действие можно подавить противоэпилептическими препаратами. Авторы также сообщают, что несмотря на то, что Данио является многообещающей моделью для изучения эпилепсии, скрининг лекарств, основывающийся на использовании одномерных показателей поведения, показывает высокий шанс ложноположительных результатов (порядка 75%) с использованием методов электрофизиологии [8].

Изучение активности определенных структур мозга Данио

В настоящее время Данио рерио также активно используется для изучения спонтанной активности конкретных структур мозга. Касательно изучения верхнего двухолмия, личинки Данио представляют собой идеальную модельную систему для данных исследований, позволяя неинвазивным способом визуализировать активность мозга на раннем этапе развития, поскольку для них хорошо изучен процесс возникновения спонтанной активности нейронов верхнего двухолмия во время развития личинки, что нельзя сказать о млекопитающих – на их моделях трудно изучить раннее проявление спонтанной активности среди популяций нейронов. В одном из таких экспериментов авторы использовали двухфотонную кальциевую визуализацию с помощью флуоресцентного индикатора H2B-GCaMP6s, ядерно-направленного белка, который показывает активность кальция только в телах клеток перивентрикулярного слоя (здесь расположены тела большинства нейронов верхнего двухолмия) и нейропиля (содержит их дендриты и аксоны, аксоны афферентов сетчатки и редко расположенные клеточные тела), но не отростков. В результате авторам удалось рассмотреть и охарактеризовать изменения в спонтанной активности по мере развития личинки Данио и сделать вывод, что 5-

6 день после оплодотворения является критическим в развитии верхнего двухолмия, так как в это время выявляются существенные изменения в организации нервных сетей [9].

Модель для изучения генетических заболеваний

Мутантные линии Данио рерио также активно используются для изучения различных генетических заболеваний человека, в том числе синдрома ломкой X-хромосомы, или синдрома Мартина-Белл (распространенная моногенетическая форма аутизма), который возникает в результате потери или нарушения экспрессии гена FMR1. Исследователи Lena Constantin, Rebecca E. Poulsen и соавторы решили выяснить, какие изменения сенсорных сетей в масштабах мозга и клетки лежат в основе сенсорных аспектов этого синдрома и аутизма в целом. Используя кальциевую визуализацию, они исследовали реакции нейронов на зрительные и слуховые стимулы у личинок рыбок Данио.

В результате им удалось выяснить, что у Данио с мутацией в гене FMR1 возникает нормальная реакция на зрительные импульсы, однако в слуховой обработке есть изменения. Так больше ответных реакций нейронов было обнаружено в таламусе и заднем мозге, а более сильный эффект был от нейронов таламуса, полукружного торуса и покрышки мозга. Также возможности декодирования определенных компонентов восходящего пути были изменены: октаволатеральное ядро в заднем мозге имело значительно более сильную способность к декодированию слуховых импульсов, чем конечный мозг у мутантов FMR1 [10].

Выводы

Данио рерио используется в качестве модельного объекта во многих лабораториях мира. Их преимущества перед остальными исследовательскими моделями: низкие затраты на содержание, малые временные затраты, простота разведения, прозрачность и относительно большие размеры эмбрионов. В научных трудах по изучению мозговой активности, Данио используются для определения взаимодействия мозговых структур, возникающего в результате поведенческой активности, для визуализации их развития при морфогенезе у личинок. Существенный вклад Данио рерио в качестве модельного объекта вносит в изучение эпилепсии, генетических заболеваний и в проведение скрининга лекарственных препаратов.

Библиографический список

1. Качанов Д.А., Лакеевков Н.М. *Danio rerio* (zebrafish) как универсальный модельный объект в доклинических исследованиях. FORCIPE. 2018; Т. 1(1)
2. Sung-Joon Cho, Donghak Byun, Tai-Seung Nam, Seok-Yong Choi. Zebrafish as an animal model in epilepsy studies with multichannel EEG recordings. Scientific reports, 2017.
3. Беляева Н.Ф., Каширцева В.Н., Медведева Н.В. Зейбрафиш как модель в биомедицинских исследованиях. Биомедицинская химия, 2010; Т. 56 (1): 120-131.
4. Ross N. W. Kettleborough, Elisabeth M. Busch-Nentwich, Steven A. Harvey. A systematic genome-wide analysis of zebrafish protein-coding gene function. Nature, 2013; Vol. 496: 494–497.
5. Máté Varga, Dorottya Ralbovszki, Eszter Balogh. Zebrafish Models of Rare Hereditary Pediatric Diseases. Diseases, 2018; Vol. 6 (2), 43.
6. Xiuye Chen, Yu Mu, Yu Hu. Brain-wide organization of neuronal activity and convergent sensorimotor transformations in larval zebrafish. Neuron, 2018; Vol. 100 (4): 876–890.
7. Jing Liu, Scott C. Baraban. Network properties revealed during multi-scale calcium imaging of seizure activity in zebrafish. eNeuro, 2019; Vol. 6 (1).
8. Peter M. Eimon, Mostafa Ghannad-Rezaie, Gianluca De Rienzo. Brain activity patterns in high-throughput electrophysiology screen predict both drug efficacies and side effects. Nat Commun, 2018; Vol. 9: 219.
9. Lilach Avitan, Zac Pujic. Spontaneous activity in the zebrafish tectum reorganizes over development and is influenced by visual experience. Current biology, 2017; Vol. 27 (16).
10. Lena Constantin, Rebecca E. Poulsen, Leandro A. Scholz. Altered brain-wide auditory networks in a zebrafish model of fragile X syndrome. BMC Biology, 2020; Vol. 18: 125.